

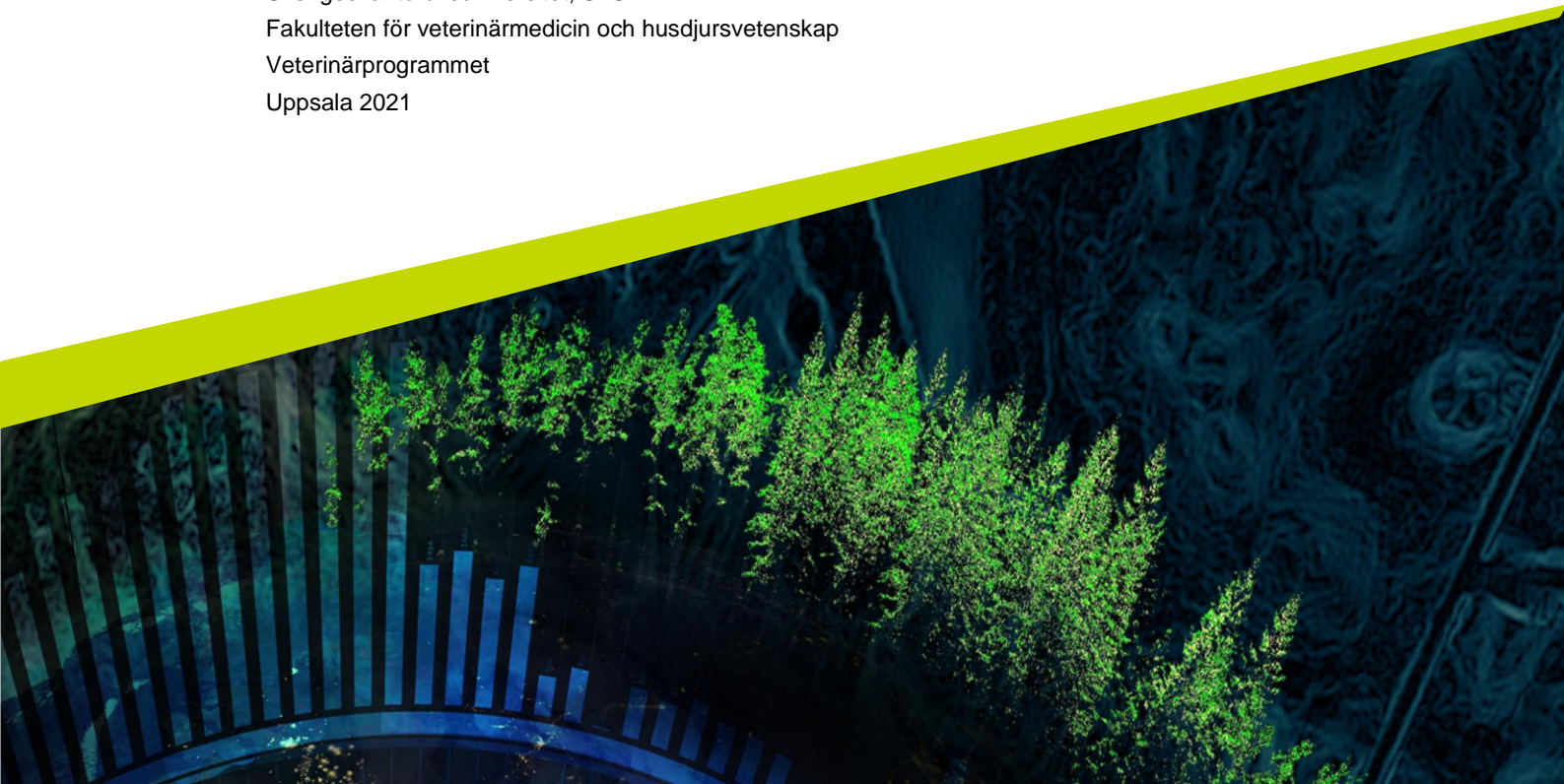


Effekter av emotionell stress på ansiktsuttryck av smärta hos häst

Effect of emotional stress on facial expression of pain in horses

Sara Hidén Rudander

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2021



Effekter av emotionell stress på ansiktsuttryck av smärta hos häst

Effect of emotional stress on facial expression of pain in horses

Sara Hidén Rudander

Handledare: Marie Rhodin, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Bitr. handledare: Johan Lundblad, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Bitr. handledare: Pia Haubro Andersen, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Examinator: Anna Jansson, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0869

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2021

Nyckelord: Häst, Smärta, Stress, Stressansikte, Smärtansikte

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för anatomi, fysiologi och biokemi

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

Det är från tidigare studier känt att hästen inte bara har ett smärtansikte utan också ett så kallat stressansikte. Stressansiktet kan vara problematiskt ur en smärt bedömningssynpunkt, då hästen befinner sig i en klinisk miljö och upplever emotionell stress. I denna studie undersöks det hur den emotionella stressen påverkar hur smärtan uttrycks i hästens ansikte. Något som till författarens bästa minne, inte undersökts tidigare. I studien ingick det 12 hästar som studerades i sin hemmiljö och som alla genomgick fyra olika interventioner i 15 minuter;

- Kontroll utan något tillfört stimuli.
- Emotionell stress i form av att bli lämnad i isolering.
- Smärta från en blodtrycksmanschett som pumpas till 240 mmHg och orsakar ischemi.
- Kombinerat försök med smärta och emotionell stress.

Alla interventioner filmades med fyra olika kameror i olika vinklar i hästens egen box. Filmklippen annoterades med hjälp av programvaran ELAN och EquiFACS. Under alla interventioner samlades hjärtfrekvensdata in med en elektrod med inbyggd sändare, som placerades över hästens hjärtsiluett.

I jämförelse med kontroll observerades en ökning av ansiktsrörelser i alla interventioner förutom interventionen med enbart ett smärtsamt stimuli. De olika förändringarna i hästens ansiktsuttryck visades med deskriptiv statistik och för de utvalda rörelser; AU101, AU145, AU47, AU5, AUH13, AU18, AD19, AD104, EAD101, EAD104 och AD38 gjordes statistiska tester.

Under interventionen med både tillförd smärta och emotionell stress visade sig främst muskelrörelser i ansiktet som är kopplade till stress som även sågs under interventionen med enbart emotionell stress var signifikanta. Testerna visar att den emotionella stressen har en betydande effekt på hästen smärtansikte och de är något som behöver tas i beaktande för att få en riktig smärtbedömning på stressade hästar. Intressanta aspekter som inte innefattas av detta arbete föreslås, som fortsatta studier och studier på en större population.

Abstract

It is known from previous studies that the horse not only has a pain face but also a so-called stress face. The stress face can be problematic from an assessment point of view, as the horse is in a clinical environment and experiences emotional stress. This study examines how emotional stress affects how pain is expressed in the horse's face. Something that, in the author's best memory, has not been investigated before. The study included 12 horses in their home environment who all underwent four different interventions for 15 minutes;

- Control without any added stimuli.
- Emotional stress in the form of being left in isolation.
- Pain from a blood pressure cuff that is pumped to 240 mmHg and causes ischemia.
- Combined experience with pain and emotional stress.

All interventions were filmed with four different cameras at different angles in the horse's own box. The film clips were annotated using the ELAN and EquiFACS software. During all interventions, heart rate data were collected with an electrode with a built-in transmitter, which was placed over the horse's heart silhouette.

In comparison with control, an increase in facial movements was observed in all interventions except the intervention with only a painful stimulus. The various changes in the horse's facial expression were shown with descriptive statistics and for the selected movements; AU101, AU145, AU47, AU5, AUH13, AU18, AD19, AD104, EAD101, EAD104 and AD38 performed statistical tests.

During the intervention with both added pain and emotional stress, mainly muscle movements in the face that are linked to stress of the type mentioned proved to be significant. The same significant codes were seen during the intervention with only emotional stress. The tests show that the emotional stress has a significant effect on the horse's pain face and they are something that needs to be taken into account to get a proper pain assessment on the horse. Interesting aspects that are not included in this work are suggested, such as further studies and studies on a larger population.

Innehållsförteckning

1. Introduktion.....	9
2. Litteraturstudie	11
2.1. Stress.....	11
2.1.1. Definition av stress.....	11
2.1.2. Neuro- och endokrina mekanismer vid stress	11
2.2. Definition av smärta.....	13
2.2.1. Neurofysiologiska mekanismer för smärta	13
2.3. Relationen mellan stress och smärta	14
2.3.1. Stressinducerad analgesi	15
2.3.2. Stress inducerad hyperalgesia	15
2.3.3. Fysiologiska förändringar vid stress och smärta.	16
2.4. The Equine Facial Action Coding System	18
2.5. Användning av beteenden för bedömning av smärta och stress	19
2.5.1. Skalor vid smärta	19
2.5.2. Skalor för stress.....	20
3. Material och Metod	21
3.1. Syfte och hypotes	21
3.2. Studiepopulation.....	21
3.3. Studiedesign.....	22
3.3.1. Kontroll.....	23
3.3.2. Stressinduktion	23
3.3.3. Smärtinduktion	23
3.3.4. Smärta och stressinduktion	23
3.4. Inklusionskriterier.....	24
3.5. Hjärtfrekvens	24
3.6. Videoinspelning	24
3.7. Videoselektion och Videoanalys.....	24
3.8. Statistik	25
4. Resultat.....	26
4.1. Smärtbedömning enligt EPS-skalan.....	26
4.2. Hjärtfrekvens	26
4.3. Överensstämmelse mellan annotörer	27
4.4. Förändringar i FACS under interventioner.	28
5. Diskussion.....	33

5.1.	Upplevde hästarna stress och smärta?	33
5.2.	Signifikanta rörelser i hästens ansikte.....	33
5.3.	Hjärtfrekvens	37
5.4.	Överensstämmelse mellan de två annotörerna	37
5.5.	Svagheter och styrkor med studien	38
5.6.	Framtida forskning.....	39
6.	Konklusion	40
	Referenser.....	41
	Tack	45
	Populärvetenskaplig sammanfattning	46
	Genomförande av studien.	46
	Behandling av datainsamling.....	47
	Statistiskt genomförande	47
	Insikter för framtida studier	48
	Bilaga 1: Frekvenstabeller.....	49

1. Introduktion

Djurvälfärden samt djurens välmående är viktigt dess livskvalité. De flesta djur lever i nutid och har endast en liten förståelse för dåtid och framtid. Ett mått på ett djurs livskvalité innefattar ett antal aspekter. Ett är att djur ska vara fria från rädsla och stress och ett annat är att djur ska vara fria från smärta. Smärta och stress är beroende av varandra och kommer att påverka varandra i olika grad (Gaynor och Muri, 2015).

Stress och smärta är två olika processer där ett flertal konceptuella och fysiologiska processer överlappar. Både stress och smärta har som huvudfunktion att påverka en individs beteende för att skydda organismen mot yttre hot och främja överlevnad (Abdallah och Geha, 2017). Ett viktigt förhållande mellan stress och smärta är att stress är kroppens svar på ett yttre stimuli, medan smärta kan vara ett sådant stimuli som gör att djuret upplever stress (Gaynor och Muri, 2015).

Det går att förutsätta att hästar och andra djur kommer vara stressade i en klinisk miljö där plats och situation är yttre stimuli som påverkar individen. Samtidigt som orsaken till besöket mycket troligen är smärtsamt, vilket i sig kan vara ett inre stimuli för stress.

Det finns flera studier som analyserat hur hästens ansiktsmimik ändras sammanhang där hästen känner smärta vilket har bidragit till utvecklingen av bedömningsskalor för hästar (Gleerup *et al.*, 2015). De finns i dagsläget flera olika skalor som används; Horse Grimace Scale, HGS (Costa *et al.*, 2014) , Equine Pain Scale (Gleerup *et al.*, 2015) och Equine Utrecht University Scale for Fascial Assessment of Pain (Equus-FAP) (van Loon and Van Dierendonck, 2015).

Dessa utnyttjas för att snabbt få en indikator på hästens status och en uppfattning om hur ont hästen har med hjälp av smärtskalan. Det har gjorts få studier på hur ansiktsmimiken vid smärta kommer att förändras i en stressfull situation. En studie av Dalla Costa *et al.* (2017) visar att HGS inte ändras vid tillförande av olika emotionella stimuli som ny miljö, bli borstad över manken och förväntan att få en belöning i form av mat. Ett undantag var rädsla, där det gick att urskilja en förändring i HGS mot kontrollgruppen (Dalla Costa *et al.*, 2017).

I en annan studie av Lundblad (2018) visas det dock att hästar som upplever en emotionell stress har haft samma ansiktsmimik som även kunnat registreras under en smärtsam upplevelse (Lundblad, 2018).

Om det går att identifiera rädsla som en typ av stress så talar det för att en förändring i hästens smärtansikte skulle ses när den under samma tid även upplever emotionell stress (Wagner 2010).

För att kunna leva upp till de fem friheterna som krävs för att få en bra livskvalité hos ett djur så bör djurhälsopersonal ha kunskap att kunna smärtlindra ett sjukt djur på rätt sätt. Denna studie görs för att vidga förståelsen för hur stress kommer att påverka en hästs smärtansikte och i vilken grad det påverkar bedömningen av smärtan.

Målsättningen med studien är att dess resultat ska kunna ligga till grund för vidare forskning, men även att dessa ska kunna tillämpas i kliniska situationer där korrekt bedömning av hästens smärta är viktigt för korrekt smärtlindring. Genom bra verktyg för smärtbedömning ökar hästens livskvalitet och detta förbättrar djurvälfaerden.

2. Litteraturstudie

2.1. Stress

2.1.1. Definition av stress

Stress är ett biologiskt skydd från faktorer som skulle kunna vara ett hot mot individens levnadsmönster. Det fysiologiska svar som ses vid en stressituation är ett adaptivt beteende för att upprätthålla homeostasen (Gaynor och Muri, 2015).

Det kan exempelvis vara så att det fysiologiska svaret av ett stresstimuli är att förbereda kroppen på en akut situation där det kan krävas att djuret behöver fly (Gaynor och Muri, 2015).

Det sympatiska nervsystemet är viktigt för överlevnad i korta stressfulla situationer. Däremot kan en utdragen stress ge många icke-önskvärda effekter, exempelvis ökar koncentrationen av både kortisol samt glukokortikoider i blodet som svar på ett stresstimuli. Vid långvarig stress kommer den ökade steroidkoncentrationen leda till nedsatt digestion, minskad aktivitet i kroppens bioenergetiska processer och ett förhöjt blodtryck. Långvarig stress ger också ett nedsatt immunförsvar och med tiden en ökad risk för systemiska sjukdomar (Sjaastad *et al.*, 2010).

2.1.2. Neuro- och endokrina mekanismer vid stress

När individer interagerar med omvärlden kommer stressfulla stimuli leda till anpassade samt missanpassade neurologiska- och hormonella svar. Akut stress kommer aktivera hypotalamus, hypofysen och binjuren (HPA- hypothalamic-pituitary-adrenal axis) (Abdallah and Geha, 2017).

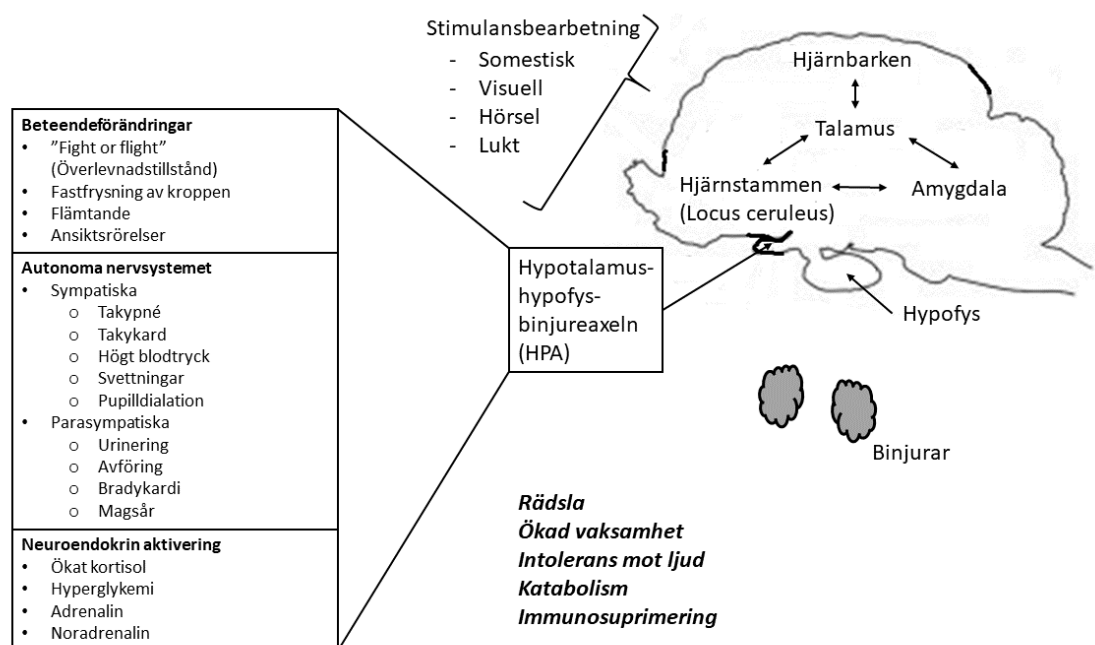
När kroppen utsätts för stress stimuleras hypotalamus till att öka produktionen av ACTH-releasing hormone (ACTHRH). Detta ökar frisättningen av ACTH från hypofysen. ACTH stimulerar cortex i binjuren att producera och frisätta bland annat kortisol och androgener som påverkar exempel till en lägre matsmältning, en ökad

vakenhet, mer blod till skelettmuskulatur och CNS, frisättning av lagrad energi (Sjaastad *et al.*, 2010).

Vid aktivering av HPA kommer man få en ökad frisättning av glukokortikoider, vilka det finns receptorer för i det limbiska systemet som inkluderar hypothalamus, amygdala, hippocampus och prefrontala hjärnbarken. I det limbiska systemet kommer glukokortikoider att fungera som transkriptionsfaktorer och har därför en långtidsverkande effekt på cellulär nivå.

Akut stress kommer även att aktivera det autonoma nervsystemet, vilket regleras av hjärnbarken. Det leder till ett ökat blodtryck och en förändring i cirkulationen med ett minskat blodflöde till digestionskanalen och ett ökat blodflöde CNS och muskler (Abdallah and Geha, 2017).

Stress kan även ha en inverkan på det limbiska systemet där tidigare erfarenheter, det psykiska tillståndet (t.ex. hunger) tillsammans med förmågan att fatta beslut kommer att uppdateras då hästen utsätts för ett stresstimuli. Det kommer ge en ultimata effekt för hur individen förändrar sitt beteende, exempelvis till ett "fight or flight mode" (Abdallah and Geha, 2017). Stressens härledning förklaras sammanfattande i Figur 1 (Gaynor och Muri, 2015).



Figur 1. Stressen härledning från stimuli till ändrat beteende av djuret i en sammanfattande bild adapterad från Gaynor och Muri (2015).

2.2. Definition av smärta

Att förstå och känna igen smärta är en väsentlig del för att tillgodose djurvälståndet (McLennan *et al.*, 2019). Upplevelsen av smärta är i sig själv unik och upplevs som ett obehag för att veta individen att den håller på att skadas eller är skadad (Sjaastad *et al.*, 2010).

International Association for the Study of Pain (IASP) beskriver smärta som "En oönskt sensorisk upplevelse, samt en känslomässig upplevelse som är kopplad till en direkt eller indirekt skada på vävnad" (van Loon och Van Dierendonck, 2018). När de gäller djur kommer det även att handla om ett ständigt försök att undvika smärta eller minska en potentiell skada (van Loon och Van Dierendonck, 2018).

2.2.1. Neurofysiologiska mekanismer för smärta

Möjligheten att känna smärta är baserad på en neurofysiologisk process av nociception vilket är lika för både människor och övriga däggdjur (Gaynor och Muri, 2015). Smärta kan delas in i nociceptiv smärta och neurogen smärta.

Nociceptiv smärta orsakas av ett skadligt stimuli som aktiverar nociceptorer. Ytlig smärta kopplas till huden, medan djup smärta kopplas till skelettmuskulatur, bindväv, ben och leder. Nociceptiv smärta kan framkallas av mekaniska, kemiska eller termiska stimuli. Ischemi som innebär ett reducerat blodflöde till vävnaden, är ett vanligt exempel på kemisk smärta som orsakas av hypoxi i skelettmuskulatur (Sjaastad *et al.*, 2010).

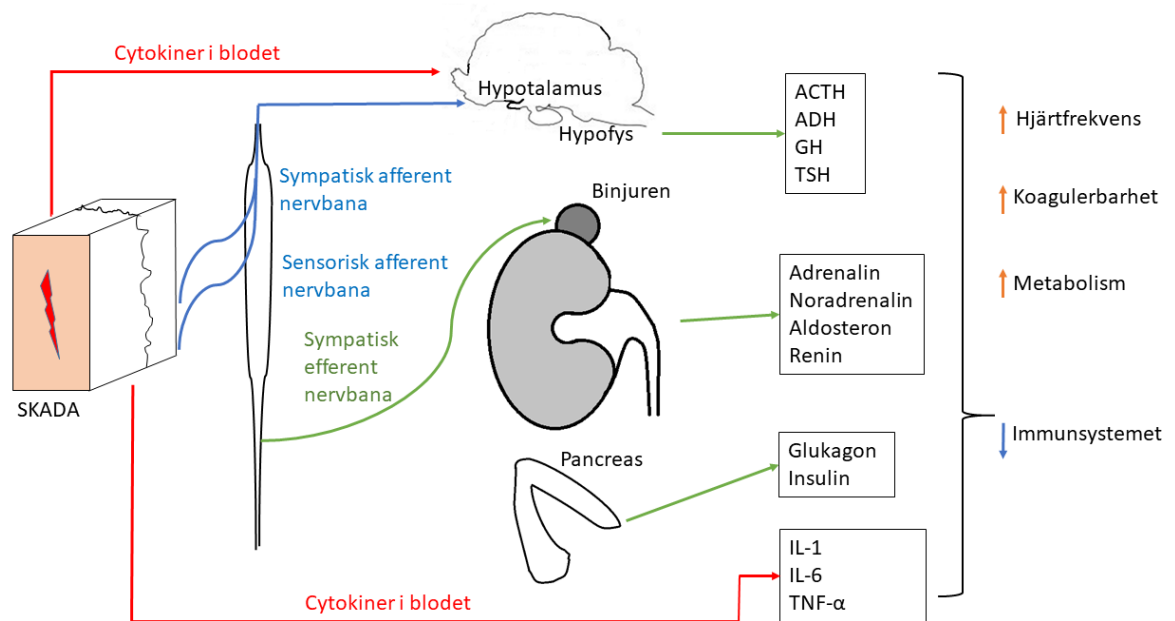
Stimuli som tyder på vävnadsskada aktiverar perifera sensoriska nociceptorer (Gaynor och Muri, 2015). Dessa består av snabbt ledande, myeliniserade, A-delta nervfibrer och långsamt ledande, omyeliniserade C-nervfibrer. Dessa kommer känna igen och omvandla de inkommande signalerna för vävnadsskada för att sedan skicka vidare en nervsignal. Signalen skickas från de perifera nervändarna till dorsalhornet i ryggmärgen där informationen överförs till nästa nerv som leder informationen vidare (Gaynor och Muri, 2015).

Det är i den sensoriska delen av hjärnbarken som den nociceptiva informationen kommer att uppfattas. Informationen bearbetas och ett, för situationen, passande svar till stimuli skapas, illustreras i Figur 2 (Gaynor och Muri, 2015).

Descenderande smärtvägar härstammar från cortex eller hypothalamus och avslutas i ryggmärgen (Butler och Finn, 2009). Nerver i cortex ger även information till

amygdala, hypothalamus eller direkt till Peri Aqueductal Grey matter (Butler och Finn, 2009).

Akut smärta stimulerar både ett sensoriskt och emotionellt svar, som kroppen kan agera på, vilket bidrar till ett förändrat beteende för att skydda kroppen från ytterligare skador (Abdallah och Geha, 2017).



Figur 2. Smärtans härledning från skadeområde till kroppens svar på stimulit. Figur adapterad från Gaynor och Muri (2015).

2.3. Relationen mellan stress och smärta

Stress och smärta är två olika men ändå liknande processer där ett flertal konceptuella och fysiologiska processer överlappar. Både stress och smärta har som huvudfunktion att ändra en individs beteende i ett försök att skydda mot yttre hot (Abdallah och Geha, 2017).

Stress i förhållande till smärta och dess övergång till ångest hos häst är viktig då ångest i sin tur ytterligare kan öka stressen. Stress kan precis som smärta triggas av yttre stimuli, för att få en respons från kroppen (Muir, 2013).

Både det sympatiska nervsystemet samt neurotransmissionen är väsentliga regulatorer för det fysiologiska svaret vid smärta och stress (Muir, 2013).

Till skillnad från stress som är ett kroppsligt svar på ett yttre stimuli så kan smärta vara det yttre stimuli som triggas igång ett kroppsligt svar i form av stress. Därför

kan smärta orsaka stress, men stress kan ej ge upphov till smärta (Gaynor och Muri, 2015). En stor mängd stress kan resultera i en försämrad allmänstatus samt försämrad levnadskvalite hos individen (Abdallah och Geha, 2017).

2.3.1. Stressinducerad analgesi

Att stress i kombination med smärta kan skapa analgesi är allmänt känt hos människor, men även hos djur. Detta kallas för SIA (Stress Inducerad Analgesi) och är en suppression av smärta som uppstår under, eller strax efter, ett kraftigt stresstimuli (Gaynor och Muri, 2015).

Den generella idén med SIA är att en individs smärtröskel höjs till en följd av stress. (Jennings *et al.*, 2014).

Detta är något som har utvecklats genom evolution då de djur som kunde fly från ett hot trots skada ändå överlevde. Man anser att SIA är en del i "Fight or Flight" (Butler och Finn, 2009).

För att uppnå SIA krävs två stimuli, ett skadligt stimuli och ett aversivt, där de aversiva stimuli både kan vara betingat och obetingat (Jennings *et al.*, 2014). Obetingad SIA uppkommer av ett obetingat stresstimuli. Exempel på obetingade stimuli som används vid försök kan vara: tvångssimning, isolation och nedsänkning i kallt vatten. När detta sker kommer djuret uppleva en analgesi både före och under exponering av ett dylikt noxious stimuli.

Ett betingat SIA kallas även för Fear Conditioned Analgesi, "FCA" och kan liknas med ett överlevnadstillstånd, ett så kallat "fight och flightmode" (Jennings *et al.*, 2014). FCA är kroppens svar för att överleva ett kritiskt tillstånd och innebär en nedreglering av nociceptorer vilket har förmågan att dämpa smärta till mer än 90 procent (Gaynor och Muri, 2015).

2.3.2. Stress inducerad hyperalgesia

Stressinducerad hyperalgesi (SIH) är en motsats till stressinducerad analgesi. Vid SIH upplever individen inte smärta på samma sätt under en stressituation. Vid SIH kommer individen istället få en ökad känslighet för smärtestimuli. Det är ofta förekommande vid kronisk smärta eller en återkommande stress (Jennings *et al.*, 2014). Det är viktigt att förstå att stress kan vara ett resultat av både ångest och rädsla, där SIA är ihopkopplat med ett direkt hot samt en "flight or fight" respons, medan SIH är ett kroppsligt svar vid återkommande ångest (Wagner, 2010).

Det finns bevis på att kronisk stress kan ge missanpassade neurobiologiska förändringar i smärtans ledningsförmåga vilket i sin tur kan vara orsaken till att SIH, uppstår (Jennings *et al.*, 2014).

2.3.3. Fysiologiska förändringar vid stress och smärta.

Smärta kan upplevas både akut och kronisk och där den akuta smärtan ofta är förhållandevis kortlivad. Detta kan vara ett svar på både yttre skada av vävnad, men de kan även bero på inflammation eller infektion (McLennan *et al.*, 2019).

Den akuta smärtan är ej längre än själva läkningsprocessen, vilket är en skillnad från den kroniska smärtan som består även efter läkningsprocessen har avtagit (McLennan *et al.*, 2019). Båda typerna av smärta aktiverar det sympatiska nervsystemet, vilket ökar puls och blodtryck samt ger en omdirigering av blodet till hjärna och skelettmuskulatur (Sjaastad *et al.*, 2010).

En högre puls är även en klinisk parameter som används för att mäta stressnivån i en situation. Stress aktiverar det sympatiska nervsystemet som leder till en ökad puls, vilket till exempel har påvisats vid transporter (Schmidt *et al.*, 2010).

Becker-Birck *et al.* (2013) studerade hästar med hyperflexion av nacken, där undersökning av HRV (heart rate variability) gjordes vilket anses visa skillnaden på om det sympatiska eller det parasympatiska nervsystemet är aktivt under en stressad situation.

HRV kännetecknas av specifika variationer i längden på inter-beat-intervall (IBI). Oregelbundenheten i IBI beror på det dynamiska samspelet mellan det sympatiska och det parasympatiska nervsystemet vid kardiovaskulär kontroll. En obalans mellan det sympatiska och parasympatiska nervsystemet är en indikator för smärta och stress. Förutsatt att man i samtidigt kan eliminera spänning och rädsla för individen som triggnande stimuli (Stucke *et al.*, 2015).

Stucke *et al.* (2015) beskriver att HRV-resultaten i olika försök beror på IBI mätningar. Samt att analysmetoder (vilket skiljer mellan olika studier) och resultat ej överensstämmer. Det är också viktigt att tänka på att det sympatiska nervsystemet aktiveras av både smärta, fysisk träning och emotionella stadier (Sjaastad *et al.*, 2010). Det finns också studier i vilka det har mätts kortisol samt HRV och HR vid transport av hästar i flygplan (Munsters *et al.*, 2013). Där korrelationen mellan höga kortisollivåer i blodet och höga HR- och HRV-värden var svag under transporten (Munsters *et al.*, 2013).

Kortisol som mätvärde för stress

Kortisol är den viktigaste glukokortikoiden som frisätts av binjuren (Sjaastad *et al.*, 2010). Kortisol transporteras i kroppen bundet till globulin som gör att kortisolets halveringstid blir längre. Kortisol är ett viktigt stresshormon som inverkar på flera organ i kroppen.

Närvaron av kortisol är bland annat nödvändig för att undvika blodtrycksfall. Under en stressad situation kommer även närvaron av kortisol att påverka koncentrationen av glukos i plasman. Detta görs genom att stimulera glukoneogenesen och hindrar upptaget av glukos i perifera vävnader.

En hög kortisolnivå kommer att höja blod plasmakoncentrationerna av fettsyror och aminosyror. Detta för att kunna ge energi åt kroppens vävnader. Vid vävnadsskada orsakad av trauma, infektioner eller annan orsak får man vanligtvis ett inflammationssvar. I vissa fall kommer detta inflammationssvar vara mer skadligt än orsaken till vävnadsskador. En hög koncentration av kortisol kommer påverka immunsvaret med en inflammationshämmande effekt av immunsystemets celler vilket kan ge ett minskat inflammationssvar (Sjaastad *et al.*, 2010).

Nivåerna av kortisol kan mätas i blod, urin, saliv, fekalier och hår (Novak *et al.*, 2013). Att mäta kortisol som en metod för att mäta stress är nyckfullt i en klinisk miljö då många olika tillstånd påverkar koncentrationen av kortisol i blodet. Både dygnsrytm (Kirkpatrick *et al.*, 1977); (Alexander och Irvine, 1998); (Aurich *et al.*, 2015) och tid på året kommer att påverka den totala kortisolnivån (Hart *et al.*, 2016).

Hart *et al.* (2016) visar i en studie att överviktiga hästar har ett högre kortisolvärde än normalviktiga. Det framgår i samma studie att ingen skillnad på kortisolnivåer kunde ses mellan hästar i olika åldrar. Något som går stick i stäv med Donaldson *et al.* (2005) som påvisar att de förekommer en åldersvariation av kortisolnivåerna. Jansson *et al.* (2006) visar i en studie att de ej förekommer en signifikant förändring i koncentrationen av kortisol i blodet när hästarna blev utfordrade 2 gånger / dag i 25 dagar, vilket skapade en frustation och aggression hos hästarna (Jansson *et al.*, 2006).

Vid stress kommer koncentration av kortisol i blodet att öka (Abdallah och Geha, 2017). Under försök med akut- samt kroniskt sjuka hästar, framgår det att kortisolnivåerna i blodet ökar via en aktivering av HPA-axeln vilket visar att den har en central roll i kroppens respons på ett smärtstimuli.

I försök har det även visats att kortisol har en större roll i den akuta smärtan än den kroniska (Ayala *et al.*, 2012).

2.4. The Equine Facial Action Coding System

I ansiktet finns det muskler, som påverkar ansiktsmimiken. Dessa muskler är en subgrupp av muskler som är innerverade av *Nervus facialis* (Wathan *et al.*, 2015). The Facial Coding System (FACS) är en metod där man kan beskriva möjlig ansiktsmimik hos en människa. Detta görs med Action Units (AU) och Action Descriptors (AD) (Cohn *et al.*, 2007).

FACS är baserat på en metodik som identifierar vilken/vilka muskler som ligger bakom en specifik rörelse i ansiktet. På senare år har FACS även tillämpats till andra djurslag såsom hästar, utvecklingen av EquiFACS påbörjades under 2015, genom en grundläggande anatomisk undersökning av hästens ansiktsmuskler genom dissektion. För att få en enhetlig bild studerades förekommande beteenden hos hästar med videokamera. Det framkom att flera av ansiktsrörelserna överensstämde med FACS både hos människa, hund, katt och schimpans m.fl. (Wathan *et al.*, 2015), (Caeiro *et al.*, 2013). Chambers och Mogil (2015) skriver att ansiktsuttrycken stämmer väl överens med varandra även mellan olika arter.

AU är en rörelse som manifesteras av en muskel. AD är istället en generell rörelse där flera muskler är involverade eller att rörelsens bakgrund ej går att härleda. När en rörelse härstammar från samma muskulatur som FACS för människa men genererar en helt annan rörelse skrivs det "H" i EquiFACS vilket ej finns i FACS, ex. AUH13 vs. AU13.

När den genererade rörelsen är lika men inte genereras från samma muskulatur som vid Human FACS så läggs det istället till en etta, ex. AU112 vs AU12. Alla koder i EquiFACS sammanfattas i Tabell 1. (Wathan *et al.*, 2015).

Tabell 1. Samtliga koder i EquiFACS.

AU101 – Inre ögonbryns höjare	EAD104 – Öronen roterar bakåt
AU143 – Blunda	AD19 – Tungan syns
AU145 – Blink	AD29 – Käkarna öppnas
AU47 – Halv blink	AD30 – Käken dras i sidled
AU5 – Övre ögonlockhöjare	AD133 – Frustar ut luft
AD1 – Ökning av ögonvitan	AD38 – Näsborrharna dilateras
AU10 – Övre läpphöjare	AD50 – Vokalisering
AU12 – läpphörndragare	AD76 – Gäspa
AU113 – skarp läppdragare	AD80 – Sväljer
AUH13 – Näsborren dras mot öronen	AD81 – Tuggar
AU16 – Undre läpp dras så att tandkött kan ses	AD84 – Huvudet skakar från sida till sida
AD160 – Undre läpp är avslappnad	AD85 – Huvudet nickar upp och ner
AU17 – Undre läppen skjuts framåt	AD86 – Kliar/ tvättar sig

AU18 – Den överläppen dras ihop medialt och orsakar en ”puck” vilket ofta dras lateralt till medialt	AD87 – Öronen skakas
AU122 – Den överläppen rullas upp, tandkött och slemhinnan på läppen insida kan ses	AD51 – Huvudet vrids åt vänster
AU24 – Läpparna trycks ihop	AD52 – Huvudet vrids åt höger
AU25 – Läpparna säras	AD53 – Huvudet förs upp
AU26 – Under käken ”tappas”	AD54 – huvudet förs ner
AU27 – Munnen öppnas	AD55 – huvudet lutar åt vänster
EAD101 – Öron fram	AD56 – Huvudet lutar åt höger
EAD102 – Avståndet mellan öronen minskar, de dras ihop.	AD57 – Mulen förs framåt
EAD103 – Öronen plattas till mot huden	AD58 – Mulen förs bakåt

2.5. Användning av beteenden för bedömning av smärta och stress

2.5.1. Skalor vid smärta

Det finns flera olika skalor i dagsläget som används för att utvärdera smärta hos hästar: Horse Grimace Scale, HGS (Costa *et al.*, 2014), Equine Utrecht University Scale for Fascial Assessment of Pain (Equus-FAP), Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment (Equus-compass) (van Loon och Van Dieren-donck, 2015), Composite multifactorial Pain Scale (CPS) (Bussi res *et al.*, 2008) och The Equine Pain Scale (Gleerup *et al.*, 2015).

Både CPS och Equus-Compass  r ett etogram som även inkluderar en betygsättning av fysiologiska parametrar, t.ex. hjärtfrekvens och andningsfrekvens. Betygsättningen kommer ge en total poäng vilket ger en indikation på hur hög smärtan hos h sten  r. CPS  r framställd f r ortopedisk smärta (Bussi res *et al.*, 2008) medan Equus-Compass  r ämnat för visceral smärta (van Loon och Van Dierendonck, 2015).

Equus-FAP använder sig av samma poängsystem som CPS och Equus- Compass. Dock kollar Equus-FAP endast på muskulära rörelser i ansiktet och poängsätter mellan 0-2 för att f r ett slutgiltigt totalpoäng hästens smärta. Försöken är gjorda med hästar som lidit av akut kolik (van Loon och Van Dierendonck, 2015). HGS bygger på Face Action Units, FAU. Sex olika FAU där man betygsätter dem 0–2 beroende på om uttrycket  r närvarande eller ej. HGS bygger på en klinisk miljö där försöks gjorts under och efter kastration av hingstar (Costa *et al.*, 2014).

Equine Pain Scale är framtagen genom att man har inducerat olika typer av smärta hos hästar, bland annat induktion av ischemi via blodtrycksmanschett placerad på hästens framben. Pain Face använder sig av 5 olika kategorier som beskriver hästens hållning, närvarande av pain face samt hur hästen interagerar med miljön, det bedöms på en skala mellan 0–4. Poängen summeras sedan vilket avgör vilken poäng på smärtskalan hästen på (Gleerup *et al.*, 2015).

2.5.2. Skalor för stress

Det finns även etogram utformade för att lättare kunna läsa av stressnivån hos en häst, kallade Behaviour Score (BS). BS-skalan är uppbyggd för att läsa av stress på avstånd, som ett verktyg för en bättre djurvälstånd. BS-skalan bygger på att man noterar olika typiska beteenden som förekommer vid stress samt hur hästen rör sig och dess kroppshållning (Young *et al.*, 2012).

Studier som har gjorts med HGS med olika tillförda emotionella stadium visar att den totala summan av HGS poängssystem inte ändras vid tillförande av olika emotionella stadium, utan att ansiktsuttrycken överensstämmer väl överens med kontrollgruppen, där inget tillförande av emotionella stadium gjordes (Dalla Costa *et al.*, 2017). En förändring i HGS sågs dock vid tillförandet av rädsla (Dalla Costa *et al.*, 2017). Då rädsla är en del av definitionen stress (Wagner, 2010), så kan man argumentera för att stress kommer påverka ansiktsuttrycket under smärta. Trots detta har de gjorts väldigt lite beskrivningar där smärtskalor väger in påverkan av både personlighet, stress eller olika sätt att hantera en främmande situation (van Loon och Van Dierendonck, 2018).

Lundblad *et al.* (2020) beskriver hur en stressad hästs ansiktsmimik förändras med hjälp av EquiFACS. Hästarna visade stress i samband med transporter. Vid försöken såg man att liknande ansiktsmimik som beskrivs i nämnda etogram även förekommer hos hästar som utsätts för en emotionell stress (Lundblad *et al.*, 2020).

Ingen av skalorna Equus-Compass, Equus-FAP eller CPS tar vid försök hänsyn till hästens emotionella stress (Bussi res *et al.*, 2008; van Loon och Van Dierendonck, 2015).

Vid försök med Equus- Compass och Equus- FAP, såg man att de äldre djuren fick ett högre totalpoäng med Equus-Compass etogrammet, medan det ej var någon skillnad mellan åldrarna med Equus-FAP (van Loon och Van Dierendonck, 2018).

3. Material och Metod

3.1. Syfte och hypotes

Syftet med den här studien är att få en ökad förståelse för ansiktsmimiken hos hästar i situationer där de upplever emotionell stress i kombination med smärta.

Hypotesen var att hästar som upplever stress i kombination med smärta kommer att få en ökad rörelse av musklerna i ansiktet. Det leder till en svårare, korrekt smärtbedömning i kliniska situationer. En häst som bara upplever stress kommer ha ett liknande ansiktsuttryck som en häst som bara upplever smärta. I en kombination av stimuli med smärta och emotionell stress, kommer rörelserna av muskler i ansiktet bli hyperaktiva.

3.2. Studiepopulation

Nio ston och tre valacker av rasen Varmblodiga travare som ägs av Institutionen för kliniska vetenskaper vid Sveriges lantbruksuniversitet användes i denna studie, se Tabell 2.

Tabell 2. Sammanställning av alla hästar som ingick i studien.

Häst	Ras	Kön	Född
Häst 1	Varmblodig Travare	Sto	2006
Häst 2	Varmblodig Travare	Sto	2007
Häst 3	Varmblodig Travare	Sto	2003
Häst 4	Varmblodig Travare	Sto	2000
Häst 5	Varmblodig Travare	Sto	2007
Häst 6	Varmblodig Travare	Sto	2013
Häst 7	Varmblodig Travare	Sto	2007
Häst 8	Varmblodig Travare	Sto	2010
Häst 9	Varmblodig Travare	Valack	2008
Häst 10	Varmblodig Travare	Valack	2000
Häst 11	Varmblodig Travare	Sto	2011
Häst 12	Varmblodig Travare	Valack	2005

3.3. Studiedesign

Försöket gjordes i tre olika faser, inducerad stress, inducerad smärta och i kombination av inducerad stress samt smärta. Utöver dessa så filmades även så kallad kontroll, vilket innebär att hästen filmas utan tillförsel av några yttre stimuli. Detta gjordes för att kunna jämföra hästens uttryck mot sig själv i kommande interventioner i förhållande till ett normaliserat tillstånd.

Hästarna flyttades till försöksstall fyra dagar innan försöken började för att få en akklimatisering. Vanliga rutiner följdes under denna period. Innan försöken började så genomgick hästarna en fullständig allmänklinisk undersökning samt smärtbedömning via EPS-skalan för att fastställa att de var friska och smärtfria. Innan varje omgång med försök filmades en kontroll i 60 minuter.

Försöken utfördes över tre dagar, med en slumpmässig ordning på interventionerna, där det under första dagen utfördes en induktion på häst A samt en på häst B. Den andra dagen utfördes två inductioner på vardera häst, varav en utfördes under förmiddagen och en på eftermiddagen. Dag tre genomfördes likt dag två. Under dag två och dag tre fick häst A och häst B minst tre timmars vila mellan inductionerna. Innan och efter varje induktion gjordes lätta kliniska undersökningar. Blodtrycksmanschetten som inducerade smärta slupades mellan hästens framben och storleken på blodtrycksmanschetten anpassades efter hästen.

3.3.1. Kontroll

Gjordes 60 minuter innan första induktion för morgonen och 60 minuter innan första induktionen på eftermiddagen. Hästen fick ej något stimuli tillfört under denna tid. Hästen hade under tiden blodtrycksmanschetten placerad på ett av frambenen. Försökspersonal satte fast blodtrycksmanschetten innan kontroll börja filmas.

3.3.2. Stressinduktion

Induceringen gjordes genom att hästen som inte genomgick intervention togs ut ur stallet. Häst A blev då lämnad själv vilket orsakade en emotionell stress hos hästen. Häst A lämnas under 15 minuter och filmades med fyra kameror placerade i boxens hörn.

3.3.3. Smärtinduktion

Induceringen utfördes när både häst A och häst B befann sig i stallet. Blodtrycksmanschetten placerades på ett av hästens framben och pumpades upp till ett tryck på 240 mmHg, vilket orsakar ischemi hos individen. Blodtrycksmanschetten fick sitta på under 15 minuter. Smärtinduceringen filmades på samma sätt som vid stressinduceringen. Var tredje minut utfördes en smärtbedömning via kamerorna utifrån hästens beteende. Ändpunkten för försöket låg på 12 poäng i en modifierad EPS-skala (för film). Ingen av hästarna fick sin induktion avbruten i förtid. Induktion utfördes på en häst i taget.

3.3.4. Smärta och stressinduktion

Denna inducering är en kombination av stressinducering och smärtinducering.

En blodtrycksmanschett pumpades upp till ett tryck på 240 mmHg på häst A innan häst B fördes ut ur stallet för att lämna häst A ensam. Induceringen pågick i 15 minuter, innan häst B togs tillbaka och trycket från blodtrycksmanschetten släpptes hos häst A. Hela induceringen övervakades via kameror och en utvärdering av smärtan gjordes var tredje minut. Den humana ändpunkten för försöket låg på 12 poäng i en modifierad EPS-skala (för film). Ingen av hästarna fick sin induktion avbruten i förtid. Induceringen utfördes på en häst i taget.

3.4. Inklusionskriterier

Alla hästar i studien var friska enligt klinisk undersökning. Ingen av hästarna hade ett värde över fyra på EPS-skalan innan försöken påbörjades.

3.5. Hjärtfrekvens

Hästarnas hjärtfrekvens mättes icke-invasivt och kontinuerligt inom tidsramen för försöken. Hjärtfrekvensen (hjärtslag/minut) mättes med Polar Wearlink tillsammans med en kopplad pulsklocka och analyserades i programmet Polar ProTrainer Equine. Avvikande hjärtfrekvensvärden togs bort med hjälp av Polars egna metod. Metoden använder sig av en algoritm där de mest avvikande värdena hittas. De avvikande värdena upptäcks av en algoritm och görs genom att ta medianen av värdena samt via olika kriterier, beroende på hur stor variabilitet som mätningen har från början.

3.6. Videoinspelning

I båda boxarna fanns det förmonterade kameror i varje hörn i höjd med boxinredningens övre kant. Kamerorna som användes var kommersiella övervakningskameror (WDR EXIR Turret Network Camera, 179 HIKVISION, Hangzhou, China).

3.7. Videoselektion och Videoanalys

Det insamlade videomaterialet analyserades i en programvara som räknar ut sannolikheten att hästens ansikte kommer vara i bild var femte sekund. Programvaran använder filmsekvenser i vilka den avgör att den med 70 procent säkerhet hittar ett ansikte.

Från de utvalda videoklippen klipptes 30 sekunders segment ut. Från topp 10 av varje segment valdes de resultatet som ligger närmast tidsenheten 10 minuter in i interventionen. Det slutgiltiga klippet började 15 sekunder före samt efter den utvalda delen.

Programmet ELAN (version 5.9, 2020), användes för att annotera de olika Action Units och Action Descriptors som kan ses i klippet. En notering görs för start och

stopp av varje AU och AD. Annoteringen görs av två stycken blindade personer som är certifierade i EquiFACS. Att kunna annotera koder i filmsekvenserna med EquiFACS kräver instruktion i form av en kurs för certifiering att kodningen kan garanteras med en 70 procent överensstämmelse jämfört med experter. Detta utförs för att säkerställa en process med en känd och accepterad kvalitet.

Omgivningen i klippen är suddig vilket gör att personen som annoterar inte kan avgöra vilken intervention hästen går igenom.

10 procent av klippen annoterades av båda personerna för att se hur väl annoteringarna överensstämmer, fem procent av klippen annoterades även två gånger av samma person.

3.8. Statistik

Kunz *et al.* (2019) har sammanställt vilka AU och AD som förekommer vid smärta hos vuxna människor utifrån hur frekvent koderna förekommer. I denna artikel presenteras en metod för att välja ut de olika koder i ansiktsmimiken som förknippas med smärta. Denna metod användes för att bestämma vilka koder som förknippas hos en häst som upplever stress, smärta samt stress i kombination med stress.

Först selekterades de AU och AD som stod för minst fem procent av koderna vid stress, smärta och stress i kombination med emotionell stress. Därefter valdes de AU och AD ut som förekom i högre frekvens när hästen upplevde emotionell stress, smärta och smärta i kombination med emotionell stress, jämfört med kontroll. Statistisk signifikans beräknas med hjälp av ett tvåvägs parat t-test för medelvärden på de utvalda AD samt AU. Utöver de koder som valdes ut med Kunz *et al.* (2019) så valdes även koder som var troliga enligt litteraturen.

Medelvärdet av hjärtfrekvensen för varje intervention räknades ut. P-värde beräknades med hjälp av ett parat två-sidigt t-test för respektive medelvärde.

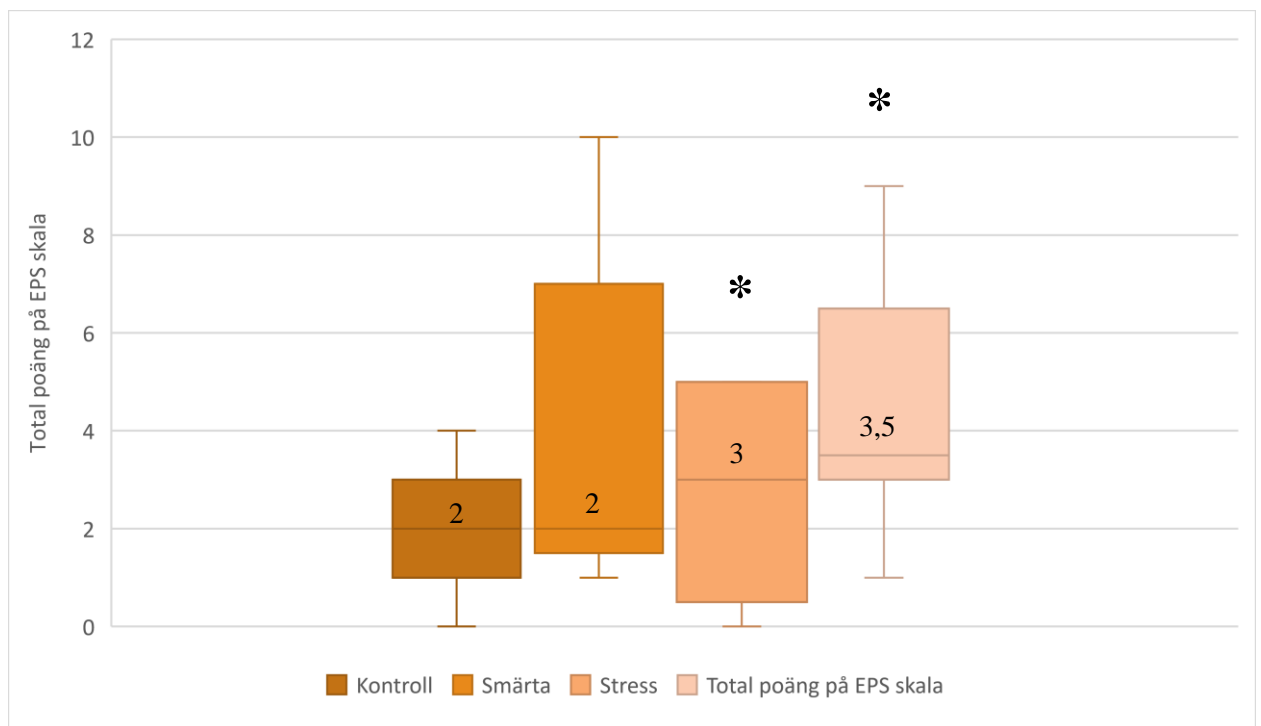
P-värde $< 0,05$ räknades som statistisk signifikant.

Överensstämmelsen mellan båda annotörer räknas ut i enlighet med tidigare FACS uppmättes tillförlitligheten med Wexlers ratio. Wexlers ratio är ett förhållande mellan antalet avtal (antalet AD och AU som annotör ett och annotör två överensstämde multiplicerat med två) dividerat med antalet möjligheter överenskommelse (de totala antalet AD och AU som görs av båda annotörer).

4. Resultat

4.1. Smärtbedömning enligt EPS-skalan

Variation av det totala EPS-värdet vid en notering utförd bredvid boxen samt medianen av dessa värden presenteras i Figur 3.



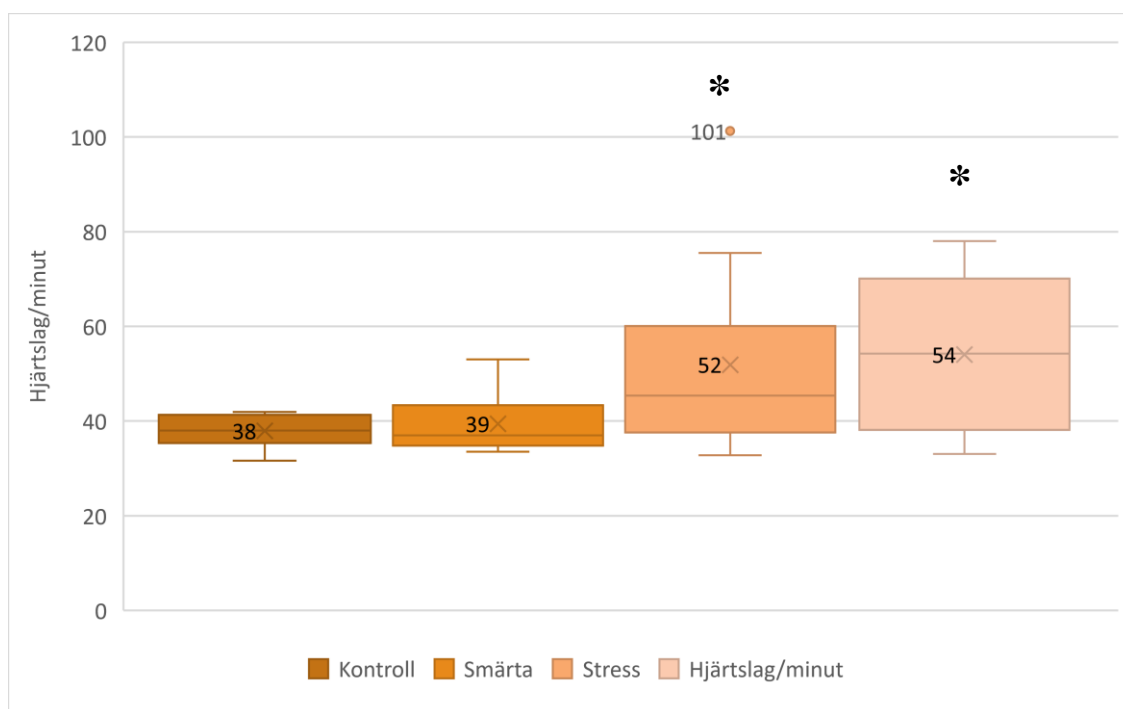
Figur 3. Variationen av den totala EPS poängen och medianen vid en smärtbedömning utförd vid hästens box under interventionerna. * Visar de induktioner som har $p < 0,05$ i jämförelse mot kontroll.

Både interventionerna stress och stress med smärta är $p < 0,05$ i jämförelse med kontroll. Interventionen med enbart smärta så är $p < 0,05$.

4.2. Hjärtfrekvens

Det genomsnittliga värdet för kontroll varierade mellan 32 och 42 slag/minut. På interventionerna smärta ligger de mellan 36-53 slag/ minut, stress mellan 33-101 slag/minut och på smärta och stress ligger den genomsnittliga hjärtfrekvensen på 33-78 slag/ minut. Fördelningen för den genomsnittliga hjärtfrekvensen ses i Figur

4. I Tabell 3 presenteras p-värdet för skillnaden interventionerna i jämförelse med kontroll interventionen.



Figur 4. Fördelningen av hästarnas genomsnittliga hjärtfrekvens, i alla olika interventioner. "×" presenterar medelvärdet för den genomsnittliga hjärtfrekvensen. * visar vilka interventioner som är signifikanta mot kontroll.

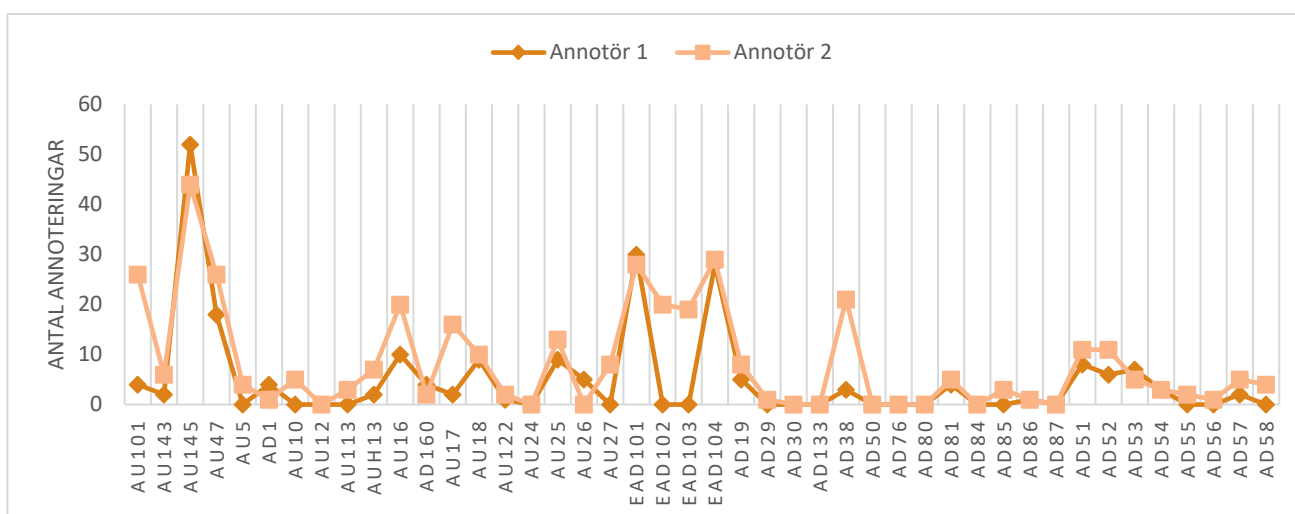
Tabell 3. P-värdet för de olika interventionerna i jämförelse med kontroll.

Interventioner	P-värde
Kontroll-Stress	0,039
Kontroll-Smärta	0,328
Kontroll- Smärta & Stress	0,005

4.3. Överrensstämmelse mellan annotörer

Mellan Annotör ett och Annotör två överensstämmer de annoterande AD och AU med 60,4 procent. I Figur 5 så kan man överskådligt se frekvensen över samtliga AD och AU, som har annoterats av annotör ett samt annotör två.

Den individuella överensstämmelsen låg på 81 procent och 88 procent för de två annotörerna.



Figur 5. Antal annoteringar av anoterade AU och AD för både annotör ett och annotör två.

4.4. Förändringar i FACS under interventioner.

Alla koder som har annoteras för varje häst 1-12 finns presenterat i Bilaga 1-4. De AU och AD som inte har blivit annoterad minst gång på någon av hästarna har tagits bort ur tabellen.

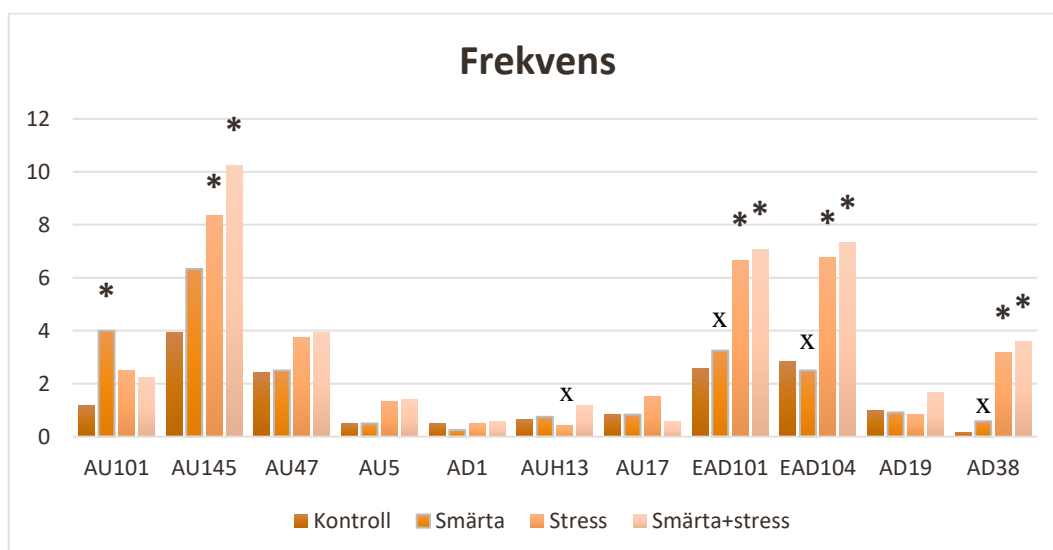
De AD och AU som förekommer mer än fem procent i varje intervention samt förekommer i en högre frekvens i interventionen än under kontroll interventionen betraktas som högtintressanta och sammanställs med den procentuella skillnaden från kontroll i Tabell 4.

Tabell 4 Specifikt utvalda koder efter de Kunz et al (2019) metod, med den procentuella skillnaden från kontroll.

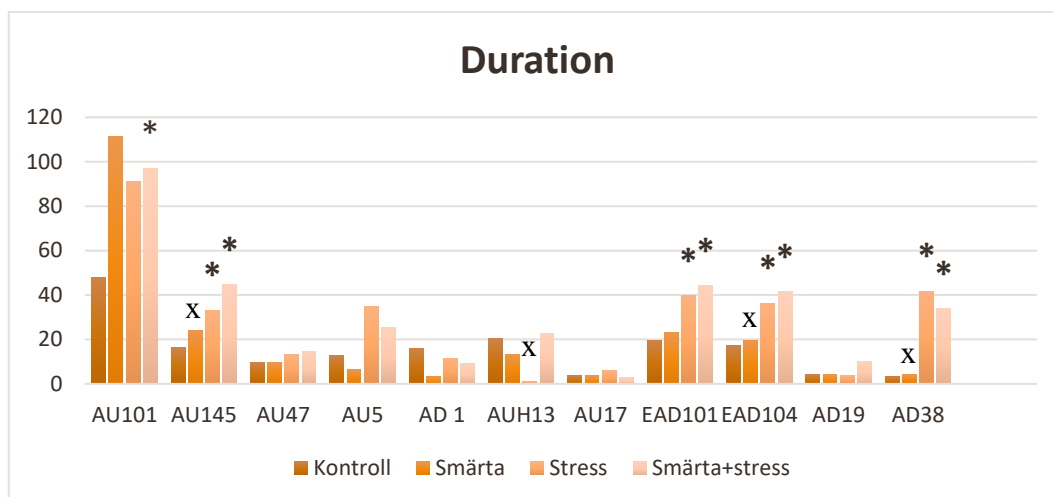
Kod.	Procentuella skillnader från kontroll.
Smärta	
AU101	243%
AU145	62%
AU47	3%
EAD101	26%
Stress	
AU101	114%
AU145	113%
AU47	55%
EAD101	158%

EAD104	138%
AD38	1800%
Smärta & Stress	
AU145	162%
AU47	62%
EAD101	174%
EAD104	159%
AD38	2050%

Utvalda AD samt AU går att studera i Figur 6. De AU och AD där frekvensen var noll alternativt det ej gick att se förändring i frekvensen så valdes den koden bort. Samma AU och AD går även att studera i Figur 7, vilket är en presentation av de olika durationerna för de mest intressanta AU samt AD.



Figur 6. Genomsnittlig frekvensen för utvalda AD samt AU. * har en signifikant skillnad mot kontroll. x= en signifikant skillnad mot smärta med stress.



Figur 7. Genomsnittlig durationen av utvalda AD samt AU. * över de staplar med en signifikant skillnad mot kontroll. X=Signifikant skillnad mot smärta med stress.

På AU och AD som ses i Figur 6 samt Figur 7, så testades den signifikanta betydelsen på både den genomsnittliga frekvensen samt durationen, för att få fram p -värdet $\alpha = 0,05$. P -värde $< 0,05$ räknas som statistiskt signifikant. De staplar som är markerade med en "*" har en statistiskt signifikant skillnad mot kontroll interventionen, de staplar markerade med "x" har en statistiskt signifikant skillnad mot smärta med stress, de presenteras sammanställd i Tabell 5. I Tabell 5 presenteras även t-tester som gjorde för skillnader i interventionerna Smärta med stress i jämförelse med interventionen med smärta och smärta med stress i jämförelse med stress.

Tabell 5. En sammanställning av de koder som genomgick parar t-test för medelvärden. Tabellen visar om de ligger över eller under $\alpha = 0,05$.

Frekvens, p -värde		Duration, p -värde	
Kontroll–Smärta			
<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
AU101	AU145		AU101
	EAD101		AU145
	EAD104		EAD101
	AD38		EAD104
	AU47		AD38
	AU5		AU47
	AUH13		AU5
	AD19		AUH13
	AD104		AD19
	AD1		AD104
	AU17		AD1
			AU17

<i>Kontroll–Stress</i>			
<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
AU145	AU101	AU145	AU101
EAD101	AU47	EAD101	AU47
EAD104	AU5	EAD104	AU5
AD38	AUH13	AD38	AUH13
	AD19		AD19
	AD104		AD104
	AD1		AD1
	AU17		AU17
<i>Kontroll–Stress och Smärta</i>			
< 0,05	>0,05	<0,05	>0,05
AU145	AU101	AU101	AU47
EAD101	AU47	AU145	AU5
EAD104	AU5	EAD101	AUH13
AD38	AUH13	EAD104	AD19
	AD19	AD38	AD104
	AD104		AD1
	AD1		AU17
	AU17		
<i>Smärta–Stress och Smärta</i>			
<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
EAD101	AU101	AU145	AU101
EAD104	AU145	EAD104	AUH13
AD38	AUH13	AD38	AU47
	AU47		AU5
	AU5		AU18
	AU18		AD19
	AD19		AD104
	AD104		AD1
	AD1		AU17
	AU17		
<i>Stress – Stress och Smärta</i>			
<0,05	>0,05	<0,05	>0,05
AUH13	AU101		AU101
	AU145		AU145
	AU47		AU47
	AU5		AU5

	AU18		AU18
	EAD101		EAD101
	EAD104		EAD104
	AD19		AD19
	AD38		AD38
	AD104		AD104
	AD1		AD1
	AU17		AU17
			AUH13

5. Diskussion

5.1. Upplevde hästarna stress och smärta?

Att veta om hästarna upplevde smärta under studien kan motiveras med EPS. EPS skalan är en bedömningsmetod av muskulära rörelser som är förekommande vid smärta och är en beskrivning av hästens smärtansikte (Gleerup *et al.*, 2015).

Metoden att inducera smärta via blodtrycksmanschett är sedan tidigare beprövad av Gleerup *et al.* (2015). Bedömningen med EPS gjordes dock men en observatör i stallet, vilket kan ha påverkat hästens muskulära rörelser. Vid försöket har båda interventionerna som involverar smärta en högre median än kontroll interventionen. Vilket talar för att vissa av hästarna upplevde smärta även om det inte var en signifikant skillnad på gruppnivå. Skillnaden är även signifikant för stress och stress med smärta. Den är dock inte signifikant för interventionen med smärta. Två av hästarnas EPS bedömningen fattades dock för interventionen för smärta vilket kan ha påverkat resultatet men även den individuella skillnaden på hästarna då de är ett fåtal hästar som har en låg poäng i både kontroll och smärta. I interventionen för smärta och stress så ingick 11 hästar och i interventionen med stress ingick endast nio av hästarna. Detta är något som påverkar uträkningen för signifikans.

Att hästarna upplevde stress kan motiveras med att de fick en signifikant skillnad i hjärtfrekvens mellan interventionerna som involverar stress mot kontroll interventionen. Definitionen av stress är ett biologiskt skydd från faktorer som skulle kunna vara ett eventuellt hot mot individens levnadsmönster (Gaynor och Muri, 2015). Genom att ta ut en av hästarna vid samma tid de vanligen tas ut i hagen och lämna den andra kvar i stallet är en ändring av hästens levnadsmönster vilket kommer att orsaka stress. Isolering är även den en beprövad metod att använda för att framkalla stress (Mal *et al.*, 1991).

5.2. Signifikanta rörelser i hästens ansikte

Få studier har gjorts på hur hästens emotionella stadier påverkar ansiktsmuskulaturen. Dalla Costa *et al.*, (2017) utförde en studie där eventuella skillnader i hästens ansiktsmimik undersöktes med totalpoäng i HGS. Resultatet var att det inte påver-

kade den totala summan av poängen, däremot kunde det inte uteslutas att en förändring skedde när rädsla tillfördes. (Dalla Costa *et al.*, 2017). Rädsla är dock en del av definitionen stress (Wagner, 2010). Det är sedan tidigare studier känt att både stress och smärta har en påverkan på hästens ansiktsmimik (Gleerup *et al.*, 2015).

Det är något som blir tydligt när resultaten från denna studie analyseras, då de AU och AD som väljs ut med hjälp av Kunz *et al.* (2019) metod visar att rörelserna som sker är förhållandevis lika mellan de olika interventionerna, vilket tyder på att en stressfaktor kan påverka hästens ansiktsmimik som ska läsas av vid en smärtbedömning.

Studiens t-tester visar att frekvensen av AU101 är statistiskt signifikant i interventionen för smärta i jämförelse med kontroll. Detta resultat visar att man kan räkna AU101 som en typisk rörelse hos en smärtpåverkad häst och skiljer sig från en tidigare studie där AU101 hade hög frekvens, men saknade signifikans (Silventoinen, 2019).

Rashid *et al.* (2020) beskriver att anledningen till att AU101 inte förekommer hos smärtpåverkade hästar kan vara att de upplever en för stor stress, vilket kan ta bort det typiska smärtuttrycket. Detta kan vara en möjlig förklaring då vissa av hästarna i studien befann sig i en klinisk miljö, vilket kan vara en stressfaktor.

Detta stämmer i så fall överens med resultaten i denna studie där interventionen smärta i kombination med stress inte får ett signifikant värde gällande frekvensen jämfört med kontroll.

Gällande durationen av AU101 var koden statistiskt signifikant i interventionen smärta och stress jämfört med kontroll. Det tyder på att under en stressad situation, där hästen samtidigt upplever smärta, kommer den muskulära rörelsen hålla i sig längre vilket gör att den syns under en längre tid jämfört med hur AU101 ter sig vid en enbart smärtsam situation. Detta innebär att AU101 är en rörelse hästen kan förutsättas uppvisa trots en stressig miljö runt omkring, dock i längre duration men kortare frekvens?. Man kan även diskutera om det är en fördel att durationen blir längre för AU101 under stress, de kan gör det lättare att avläsa rörelsen i en situation där hästen upplever både stress med smärta och i det fallet så är det en fördel att enbart använda sig av durationen snarare än frekvensen.

Flertalet signifikanta koder identifierades med avseende på frekvens samt duration, när interventionen stress jämfördes mot kontroll.

AU145, EAD101, EAD104 och AD38 var alla signifikanta både i frekvens och duration. Detta är ett resultat som överensstämmer bra med tidigare studie utförd av Lundblad *et al.* (2020).

Dessa rörelser är inte statistiskt signifikanta för interventionen smärta, men de är statistiskt signifikanta för interventionen stress i kombination med smärta. De båda stimuli som tillfördes har haft en synergieffekt med avseende på rörelser i hästarnas ansikten.

Detta innebär att stressen ger hästen ett hyperaktivt uttryck i ansiktsmimiken, vilket i sin tur innebär en svårtolkad smärtgrad i en miljö där hästen samtidigt är stressad. Då smärta kan fungera som en typ av stressfaktor (Gaynor och Muri, 2015), går det att argumentera för att stressresponsen hos en häst blir större med två faktorer som inverkar på hästens stressbeteende.

Att AD 38 är en rörelse som ofta förekommer med stress och är även ett resultat som presenteras av Lundblad *et al.* (2020). AD 38 är också en rörelse som förekommer i en hög procentuell skillnad i interventionen smärta med stress, dock inte i interventionen smärta.

AD 38 är även statistiskt signifikant för både frekvens och duration för både interventionerna stress och smärta med stress, den procentuella skillnad från kontroll är även högre gällande AD38 i stress med smärta än i bara stress, vilket även det tyder på en hyperaktivitet av rörelser i hästens ansikte.

Det går också att diskutera om AD38 är en rörelse man ska hänsyn till i en smärtbedömning om den är signifikant för stress men ej för smärta. Detta är dock inte överensstämmande med Silvetoinens studie där man kunde bevisa att AD38 var statistisk signifikant för smärta, studien var dock delvis utförd i klinisk miljö där stress från den kliniska miljön kan vara en bidragande orsak till resultatet.

HGS och EPS smärtskalor som båda använder sig av bland annat näsborrarna för att bedöma hästens smärtgrad (Gleerup *et al.*, 2015).

AD38 ökar signifikant vid både stress och smärta med stress vilket kan gör det svårt att utföra en korrekt smärtbedömning. Resultaten går att tolka som att stressuttrycken tar över hästens smärtansikte.

Även andra faktorer som dålig miljö och kondition skulle kunna påverka att hästen har dilaterade näsborrar och det skulle kunna påverka resultatet av studien.

AD1 är en rörelse som gör att ögonvitan syns (Gleerup *et al.*, 2015) och som i etogram beskrivs som en smärtrörelse. Rörelsen har vid tidigare studier haft en högre frekvens vid smärtinterventioner än i kontrollinterventionen, men inte varit statistiskt signifikant (Rashid *et al.*, 2020).

Både AD1 och AU5 är rörelser där ögat ser större ut. (Gleerup *et al.*, 2015).

Lundblad *et al.* (2020) visade i sin studie att AU5 var signifikant för stress, detta gick däremot inte att visa i denna studie, dock hade man en annan typ av induktion-smetod då hästarnas stress stimuli var att bli transporterade i en hästtransport. Lundblad *et al.* (2020) hade även fler hästar i studien.

P-värdet för AU5 vid jämförelse mellan kontroll och smärta är 1,00 och förekommer därför i samma genomsnittliga frekvens både vid smärt-interventionen som vid kontroll.

Detta innebär att stora ögon hos en häst är en större del i hästens stressansikte än smärtansikte och att rörelsen inte bör tolkas till att hästen känner smärta. Denna rörelse skulle även kunna dölja andra rörelser som sker runt om ögat till exempel AU101 och AD1.

Vid t-tester för skillnaden mellan interventionerna smärta och stress i jämförelse med smärta så är de koderna EAD101, EAD104 (öronrörelser) och AD38 som är de som har en signifikant skillnad i frekvens. Gällande duration så är de koderna AU145, EAD104 och AD38 som skiljer sig mellan interventionerna. Man kan med större säkerhet då säga att öronrörelser och dilation av näsborrarna är rörelser som främst ses då hästen är stressad. Men de är även områden man studerar vid en smärtbedömning och nivån av stress kommer med säkerhet att påverka avläsningen av hästens smärtansikte.

AU145 är en rörelse som är signifikant när man jämför kontroll med både stress och smärta med stress men i jämförelse mellan smärta och smärta med stress så finns den inte en signifikant skillnad i frekvensen dock är resultaten signifikanta gällande durationen. T-testerna mellan smärta och smärta med stress är nästan identiska med resultatet mellan kontroll och stress samt kontroll och smärta med stress, där den enda skillnaden är AU145 med avseende på frekvensen.

Vid t-tester för skillnaden mellan interventionerna stress och smärta i jämförelse med stress så finns det ingen signifikant skillnad i duration. AUH13 är den enda koden som är signifikant gällande frekvensen. De koder som främst har diskuterats så fanns de ingen med en signifikant skillnad, det är något som tyder på att de är fram för allt de rörelserna som sågs vid stress under studien som även är de som

lyser igenom och tar över mimiken hos hästen när man också blandar in smärta. Det talar för att en häst som upplever en emotionell stress i samband med en smärtsam situation kommer ha till stor del samma ansiktes mimik som en stressad individ och de klassiska rörelserna som ses vid smärta kommer ej få samma plats.

5.3. Hjärtfrekvens

Enligt utfört t-test kan man säga att ökningen i hjärtfrekvens är signifikant i interventionerna med stress samt kombinationen av smärta och stress. För interventionen med enbart smärta finns ingen signifikant ökning av hjärtfrekvensen i jämförelse med kontroll.

Vid en studie där hjärtfrekvens mättes under transport av hästar har paralleller kunnat dras mellan hög hjärtfrekvens och stress (Schmidt *et al.*, 2010). Detta är dock ett omtalat ämne då en annan studie inte kunde visa ett samband mellan höga kortisolvärden och hög hjärtfrekvens (Munsters *et al.*, 2013). Connysson *et al.*, (2017) visar i sin studie att kortisolvärden kan påverkas beroende av hästens foderstat, vilket kan påverka resultatet. Samma studie visar att hästar haft en påfallande låg puls (45-50/ minut) vid transporter (Connysson *et al.*, 2017). Vilket kan tala för att transporter inte är ett säkert stressmoment, det kan finnas en individuell variation hur hästar reagerar på momentet.

Att denna studie visar att det inte förekommer en signifikant ökning av hjärtfrekvensen vid smärta men vid induceringen stress och smärta med stress, stämmer överens med en studie där man undersökte HRV och den genomsnittliga hjärtfrekvensen på en grupp hästar med inducerad smärta. (Reid *et al.*, 2017) Den inducerade smärtan var i form av ett kirurgiskt instrument som klämdes fast på hästens hals, vilket gör att resultaten inte är rakt av jämförbara med smärtscenariot i denna studie.

5.4. Överensstämmelse mellan de två annotörerna

Under annoteringarna för försöken användes två olika annotörer med en uppmätt överensstämmelse på 60,1 procent. Grad av överensstämmelse (Intra-rater agreement) för annotörerna låg på 88 procent samt 81 procent. När skillnaden i frekvens för de olika koderna undersöks gäller det framför allt skillnader i öronrörelserna EAD102 och EAD103, men även små muskulära rörelser som AU101, AU16, AU17 samt AD38. Att det främst är dessa koder som skiljer sig åt går bara att diskutera då det inte finns utförda t-tester. De olika annotörerna kan tänkas ha en individuell gräns för vad de räknar som en rörelse och kan vara en orsak till att just dessa FACS skiljer sig åt. Men även tidigare erfarenhet kan ha påverkat annotörerna till att annotera filmerna olika. Annotörerna har en låg överensstämmelse med just

smärtsamma koder, de kan tyda på att alla hästar kanske inte upplevde smärtan på samma sätt, men de kan även vara att dessa koder har varit svårare att koda på film vilket har gjorts att rörelser har missats. Att till exempel AU101 skiljer sig åt kan bero på filmens kvalitet, vilket gör det svårt att urskilja de mindre muskulära rörelsen på en häst i rörelse.

Det är även värt att notera att klippen i studien är både längre och ur en annan vinkel än de övningsklipp som gjordes för att bli certifierad innan annoteringen började.

5.5. Svagheter och styrkor med studien

En svaghet med studien är att överensstämmelsen mellan de två annotörerna låg på gränsen till vad som är godtyckligt och att det framförallt är vissa koder där den annoterade frekvensen skiljer sig avsevärt på några få koder, där det framgår att tolkningen av hästens rörelser noterats på två olika sätt. Detta kan i sin tur leda till att rörelser missas som skulle kunna vara av signifikant värde.

De koder som även hade en stor skillnad i frekvens var även koder som var signifikanta. Det skulle i sin tur kunna ha gett ett falskt signifikant resultat.

Det är även en svaghet att inte all data från EPS bedömningarna finns med, vilket kan ha påverkat resultatet för vilka interventioner som var signifikanta eller ej.

Trots att studien använder samma hästar som kontrollgrupp för att just ta hänsyn till de olika individuella variationerna, finns det fortsatt en individuell skillnad för vad varje individ upplever som stress. Att bli lämnad själv utan artfränder under en kortare period kan ge olika grad av stress, då den typen av stress kan anses vara olika för varje individ och därför påverka vilka ansiktsuttryck hästen visar. Hästar kan även uppleva smärta på olika sätt, de finns även här individuella variationer där en del individer kan vara mer smärt tåliga än andra. Detta är dock en sak som är svår att komma ifrån.

När det gäller smärtinterventionen så finns den en möjlighet att blodtrycksmanschetten hamnar på samma ben för hästen och kan med det potentiellt påkalla både stress och en högre smärta i benet än vad hästen kände under första gången som den pumpades upp. En styrka med studien är att alla hästar utsattes för samma typ av smärta och samma typ av emotionella stress, under lika lång tid. Detta är inget som är möjligt i en studie som görs på en klinik.

5.6. Framtida forskning

I framtiden bör man inkludera fler annotörer för att få en högre överensstämmelse men även för att se över hur mycket den individuella faktorn skiljer sig åt. En svaghet med studien är den låga överensstämmelsen mellan annotörerna och de är något man i framtiden bör ta i beaktande för att få ett säkrare resultat. Man skulle även studera vidare på filmerna från studien och använda sig av andra annotörer för att se hur väl deras resultat skulle stämma överens med resultaten från studien.

Man bör även ha en större studiepopulation för att även de kan stärka resultatet. Det skulle även kunna vara intressant att göra liknade försöket i en klinisk miljö för att se hur man kan använda resultatet som ett verktyg för att hjälpa till med en korrekt smärtavläsning.

6. Konklusion

Resultatet med studien visar att när smärta och stress kombineras så får hästen ett hyperaktivt uttryck av ansiktsmimiken, vilket innebär att det blir svårt att tolka hästens smärtgrad på ett rättvist sätt. De uttryck som var signifikanta i stressinduktionen var även de som tog överhand i inductioner med både stress och smärta. Samma rörelser såg man inte i inductionen för enbart smärta. Det finns även signifikanta skillnader i samma rörelser i en jämförelse mellan inductionerna smärta och smärta med stress vilket talar för att de muskulära rörelserna som uppkommer vid stress gör det svårt för en rättvis smärtbedömning. Studien har öppnat dörren för att fortsätta forskning inom området med större studiepopulationer och möjligen fler annotörer. Försöken bör göras under kontrollerade former så att man kan garantera att hästarna får uppleva stress samt smärta. Även studier där man även inkluderar hästar som befinner sig i en klinisk miljö i jämförelse med samma häst på hemma plan bör utföras.

Referenser

- Abdallah, C.G., Geha, P. (2017). Chronic pain and chronic stress: two sides of the same coin? *Chronic Stress*. 1, <https://doi.org/10.1177/2470547017704763>
- Alexander, S.L., Irvine, C.H. (1998). The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: the importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. *Journal of Endocrinology*, 157, 425–432. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1570425>
- Aurich, J., Wulf, M., Ille, N., Erber, R., von Lewinski, M., Palme, R., Aurich, C. (2015). Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domestic Animal Endocrinology*, 52, 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.01.003>
- Ayala, I., Martos, N.F., Silvan, G., Gutierrez-Panizo, C., Clavel, J.G., Illera, J.C. (2012). Cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin, adrenaline and noradrenaline serum concentrations in relation to disease and stress in the horse. *Research in Veterinary Science*, 93, 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.05.013>
- Becker-Birck, M., Schmidt, A., Wulf, M., Aurich, J., Wense, A. von der, Möstl, E., Berz, R., Aurich, C. (2013). Cortisol release, heart rate and heart rate variability, and superficial body temperature, in horses lunged either with hyperflexion of the neck or with an extended head and neck position. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 322–330. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01274.x>
- Bussi eres, G., Jacques, C., Lainay, O., Beauchamp, G., Leblond, A., Cador , J.-L., Desmaizi eres, L.-M., Cuvelliez, S.G., Troncy, E. (2008). Development of a composite orthopaedic pain scale in horses. *Research in Veterinary Science*, 85, 294–306. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.10.011>
- Butler, R.K., Finn, D.P. (2009). Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology*, 88, 184–202. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.003>
- Caeiro, C., Waller, B., Zimmermann, E., Burrows, A., Davila-Ross, M. (2013). Orang-FACS: A muscle-based facial movement coding system for orangutans (*Pongo spp.*). *International Journal of Primatology*, 34, 115–129. <https://doi.org/10.1007/s10764-012-9652-x>
- Chambers, C.T., Mogil, J.S. (2015). Ontogeny and phylogeny of facial expression of pain. *Pain*, 156, 798–799. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000133>
- Cohn, J., Ambadar, Z., Ekman, P. (2007). *Observer-based measurement of facial expression with the Facial Action Coding System*. [WWW Document]. undefined. URL /paper/Observer-based-measurement-of-facial-expression-the-Cohn-Ambadar/eafda8a94e410f1ad53b3e193ec124e80d57d095 (accessed 9.21.20).

- Connysson, M., Muhonen, S., Jansson, A. (2017). Road transport and diet affect metabolic response to exercise in horses', *Journal of Animal Science*, 95(11), pp. 4869–4879. doi: 10.2527/jas2017.1670.
- Costa, E.D., Minero, M., Lebelt, D., Stucke, D., Canali, E., Leach, M.C. (2014). Development of the Horse Grimace Scale (HGS) as a pain assessment tool in horses undergoing routine castration. *PLOS ONE* 9, e92281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092281>
- Dalla Costa, E., Bracci, D., Dai, F., Lebelt, D., Minero, M. (2017). Do Different emotional states affect the horse grimace scale score? A pilot study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 54, 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.03.221>
- Donaldson, M.T., McDonnell, S.M., Schanbacher, B.J., Lamb, S.V., McFarlane, D., Beech, J. (2005). Variation in plasma adrenocorticotrophic hormone concentration and dexamethasone suppression test results with season, age, and sex in healthy ponies and horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, 217–222. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19<217:vipahc>2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19<217:vipahc>2.0.co;2)
- ELAN (Version 5.9) [Computer software]. (2020). Nijmegen: Max Planck Institute for Psycholinguistics, The Language Archive. Retrieved from <https://archive.mpi.nl/tla/elan>"
- Gaynor, J.S., Muri III, W.W. (2015). *Handbook of Veterinary Pain Management*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-67083-0>
- Gleerup, K.B., Forkman, B., Lindegaard, C., Andersen, P.H. (2015). An equine pain face. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 42, 103–114. <https://doi.org/10.1111/vaa.12212>
- Hart, K.A., Wochele, D.M., Norton, N.A., McFarlane, D., Wooldridge, A.A., Frank, N. (2016). Effect of age, season, body condition, and endocrine status on serum free cortisol fraction and insulin concentration in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30, 653–663. <https://doi.org/10.1111/jvim.13839>
- Jansson, A., Sandin, A., Lindberg, J. E. (2006). Digestive and metabolic effects of altering feeding frequency in athletic horses, undefined. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 3(2), 83-91.
- Jennings, E.M., Okine, B.N., Roche, M., Finn, D.P. (2014). Stress-induced hyperalgesia. *Progress in Neurobiology*, 121, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.06.003>
- Kirkpatrick, J.F., Wiesner, L., Baker, C.B., Angle, M. (1977). Diurnal variation of plasma corticosteroids in the wild horse stallion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 57, 179–181. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(77\)90370-X](https://doi.org/10.1016/0300-9629(77)90370-X)
- Kunz, M., Meixner, D., Lautenbacher, S. (2019). Facial muscle movements encoding pain-a systematic review. *Pain*, 160, 535–549. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001424>
- Lundblad, J. (2018). *Changes in facial expressions during short term emotional stress as described by a Facial Action Coding System in horses*. (Examensarbete). Sveriges

- lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <https://stud.epsilon.slu.se/13418/> (accessed 10.21.20).
- Lundblad, J., Rashid, M., Rhodin, M., Andersen, P. (2020). Facial expressions of emotional stress in horses. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2020.10.19.345231>
- Mal, M.E., Friend, T.H., Lay, D.C., Vogelsang, S.G., Jenkins, O.C. (1991). Behavioral responses of mares to short-term confinement and social isolation. *Applied Animal Behaviour Science*, 31, 13–24. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(91\)90149-R](https://doi.org/10.1016/0168-1591(91)90149-R)
- McLennan, K.M., Miller, A.L., Dalla Costa, E., Stucke, D., Corke, M.J., Broom, D.M., Leach, M.C. (2019). Conceptual and methodological issues relating to pain assessment in mammals: The development and utilisation of pain facial expression scales. *Applied Animal Behaviour Science*, 217, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2019.06.001>
- Muir, W. (2013). Stress and pain: Their relationship to health related quality of life (HRQL) for horses. *Equine Veterinary Journal*, 45, 653–655. <https://doi.org/10.1111/evj.12152>
- Munsters, C.C.B.M., de Gooijer, J.-W., van den Broek, J., van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M.S. (2013). Heart rate, heart rate variability and behaviour of horses during air transport. *Veterinary Record*, 172, 15. <https://doi.org/10.1136/vr.100952>
- Novak, M.A., Hamel, A.F., Kelly, B.J., Dettmer, A.M., Meyer, J.S. (2013). Stress, the HPA axis, and nonhuman primate well-being: A review. *Applied Animal Behaviour Science, Special Issue: Laboratory Animal Behaviour and Welfare*, 143, 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.10.012>
- Rashid, M., Silventoinen, A., Gleeup, K.B., Andersen, P.H. (2020). Equine Facial Action Coding System for determination of pain-related facial responses in videos of horses. *PLOS ONE* 15, e0231608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231608>
- Reid, K., Rogers, C.W., Gronqvist, G., Gee, E.K., Bolwell, C.F. (2017). Anxiety and pain in horses measured by heart rate variability and behavior. *Journal of Veterinary Behavior*, 22, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.09.002>
- Schmidt, A., Hödl, S., Möstl, E., Aurich, J., Müller, J., Aurich, C. (2010). Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naïve horses during repeated road transport. *Domestic Animal Endocrinology*, 39, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.06.002>
- Silventoinen, A. (2019). *Clustering of facial action units in horses with pain*. (Examensarbete). Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet. <https://stud.epsilon.slu.se/14892/> (accessed 12.8.20).
- Sjaastad, O.V., Sand, O., Hove, K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*, second edition. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Stucke, D., Ruse, M.G., Lebelt, D. (2015). Measuring heart rate variability in horses to investigate the autonomic nervous system activity - Pros and cons of different methods. *Applied Animal Behaviour Science*, 166, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.02.007>

- van Loon, J.P.A.M., Van Dierendonck, M.C. (2018). Objective pain assessment in horses (2014–2018). *Veterinary Journal*, 242, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.10.001>
- van Loon, J.P.A.M., Van Dierendonck, M.C. (2015). Monitoring acute equine visceral pain with the Equine Utrecht University Scale for Composite Pain Assessment (EQUUS-COMPASS) and the Equine Utrecht University Scale for Facial Assessment of Pain (EQUUS-FAP): A scale-construction study. *Veterinary Journal*, 206, 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.08.023>
- Wathan, J., Burrows, A.M., Waller, B.M., McComb, K. (2015). EquiFACS: The Equine Facial Action Coding System. *PLOS ONE* 10, e0131738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131738>
- Young, T., Creighton, E., Smith, T., Hosie, C. (2012). A novel scale of behavioural indicators of stress for use with domestic horses. *Applied Animal Behaviour Science*, 140, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.05.008>

Tack

Vill rikta ett stort tack till min handledare Marie Rhodin samt biträdande handledare Johan Lundblad och Pia Haubro Andersen för kloka ord och stöd under hela ex-jobbsarbetet.

Vill även rikta ett speciellt tack till mina syskon, Jacob, Petter och Hannah för all hjälp och stöd!

Populärvetenskaplig sammanfattning

Likt tidigare forskning på människor och andra djur såsom primater, hundar och katter, så har även hästar påvisat att de har ett speciellt ansiktsuttryck när individen upplever något som är smärtsamt. På häst kallas det för att hästen har ett smärtansikte. Genom att känna till hur det ser ut går det att på en häst se om den upplever smärta.

Studiet har visat att hästen kan uppvisa ett liknande ansiktsuttryck när den upplever någon form av stress. Detta betyder att en häst som utsätts för en stressfaktor, så som ett besök i på en klinik, både kan uppleva smärta och stress. Sedan tidigare finns det få studier i vilka det har undersökts hur stressen påverkar hästens smärtansikte. Vilket gör det problematiskt att tolka hästens smärtgrad korrekt inför att kunna ge lämplig smärtlindring.

Genomförande av studien.

I studien ingick det 12 hästar som alla fick genomgå fyra olika försökssituationer. Allt filmades för en senare analys. Hästarna deltog i försöken parvis under tre dagar i utförandet av alla försökssituationer.

Hästarna fick genomgå så kallad kontroll, vilket innebär att hästen filmas utan att tillförsel av några yttre stimuli. Detta gjordes för att kunna jämföra hästens uttryck mot sig själv i kommande interventioner i förhållande till ett normaliserat tillstånd.

Förutom kontroll interventionen så fick hästarna även genomgå försökssituationer baserade på stress, smärta och smärta i kombination med stress.

För att hästen skulle uppleva stress så lämnades den själv i stallet utan en artfrände under 20 minuter. Vid induceringen av smärta pumpades en blodtrycksmanschett upp som satt på ett slumpvis, utvalt framben. Manschetten gavs ett tryck på 240 mmHg, var på det läts sitta kvar i maximalt 20 minuter.

Att ha en uppumpad blodtrycksmanschett kommer försvåra blodets rörelse förbi området och vävnaden i samma område kommer ej få tillräckligt med syre. Situationen kommer att upplevas smärtsam och kan liknas med smärtan av att en kroppsdel "vaknar" efter att ha "somnat".

För att hästarna skulle få uppleva både smärta och stress under samma inducering så kombinerades båda de tidigare beskrivna försökssituationerna, vilket man lät pågå i 15 minuter.

Behandling av datainsamling.

De insamlade materialet i form av filmer bearbetades till 30 sekunders klipp. Till hjälp användes ett datorprogram som analyserar i vilka sekvenser där det finns störst sannolikhet att hästens ansikte syns. Varje intervention på en häst motsvarar ett filmklipp som annoterades med hjälp av EquiFACS, i ett filmhanteringsprogram som kallas ELNA.

EquiFACS är en metod för att beskriva rörelser i ansiktet hos hästar. Varje rörelse utgår från en att individen i frågan höjer sitt ögonbryn. Ett flertal koder beskriver de olika rörelserna i hästens ansikte.

Att kunna annotera koder i filmsekvenserna med EquiFACS kräver instruktion i form av en kurs för certifiering för intyg att kodningen kan garanteras med en 60 procent överensstämmelse jämfört med andra certifierade. Detta utförs för att säkerställa en process med en känd och accepterad kvalitet.

För att säkerhetsställa kvalitén på annoteringarna som gjordes av de två certifierade personerna så kodades 10 procent av filmerna av dem för jämförelse. Dessutom kodades fem procent av filmerna två gånger av en person för att undersöka hur regelbundet samma individ kodar.

Statistiskt genomförande

För ett urval av ansiktsrörelser som var relevanta användes en metod som innebär att den angivna koden måste leva upp till två olika krav. Den måste utgöra fem procent av alla rörelser som utförs och den måste ha en högre frekvens än samma kod under kontroll. Förutom de koderna som valdes ut med den metoden så valdes även ytterligare några ut baserat på litteraturen.

De olika frekvenserna för alla interventionen jämfördes med kontroll och analyserades för att se om de fanns en statistisk signifikans, vilket innebär att det med säkerhet går att säga att det är en skillnad mellan resultaten. Analyser gjordes både för frekvensen av de utvalda rörelserna men också för durationen för samma rörelser.

Resultatet visade att frekvensen och durationen för både öronrörelser, blinkning och ett vidgande av näsborrarna var signifikant högre när hästen upplever stress i jämfördes med kontroll. Men samma resultat återgavs också för interventionen när hästen upplevde smärta och stress samtidigt i jämförelse med kontroll. I interventionen för smärta sågs enbart en signifikant ökning av frekvensen för rörelsen AU101, vilket är en rörelse där den inre delen av ögonbrynet dras uppåt.

Insikter för framtida studier

Med den nya insikten går det att avgöra om stress kommer påverka det klassiska smärtmönstret i en hästs ansikte i den utsträckningen att de skulle kunna vara svårt att få en fullgod bedömning av hästens smärta i en stressad miljö. Att känna till detta är en viktig insikt att ha med i bedömning av smärta för de som jobbar med djuren kliniskt.

Detta är ett område i vilket det skulle behövas mer forskning och med undersökningar i större populationer för att få säkrare resultat.

Bilaga 1: Frekvenstabeller

Kontroll	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5	Nr 6	Nr 7	Nr 8	Nr 9	Nr 10	Nr 11	Nr 12
AU101	3	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	7
AU143	1	1	0	0	0	0	0	0	8	0	2	0
AU145	8	2	5	1	6	6	4	3	4	1	0	7
AU47	2	0	2	1	5	11	1	1	2	1	3	0
AU5	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0
AD1	2	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AU10	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AU113	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AUH13	0	2	0	2	0	1	0	0	1	0	2	0
AU16	0	7	0	0	0	5	0	0	1	0	2	0
AD160	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0
AU17	0	2	0	0	0	3	0	1	1	0	3	0
AU18	0	2	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0
AU122	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU25	0	4	0	0	0	2	0	5	0	5	0	0
AU27	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EAD101	1	1	0	2	4	7	4	1	8	0	2	1
EAD102	3	4	0	1	0	0	0	0	5	0	4	0
EAD103	0	4	0	0	0	2	0	0	3	0	3	0
EAD104	3	1	2	2	6	5	3	1	6	2	2	1
AD19	0	0	0	0	0	6	0	6	0	0	0	0
AD29	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD133	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AD38	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
AD81	0	1	0	0	0	0	1	1	2	1	0	0
AD84	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AD85	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AD51	0	0	1	0	1	3	2	0	1	1	0	0
AD52	1	0	0	1	0	2	0	1	1	0	0	0
AD53	1	3	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0
AD54	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AD55	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
AD57	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
AD58	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
AD100	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1

AD101	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD104	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD105	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

Smärta	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5	Nr 6	Nr 7	Nr 8	Nr 9	Nr 10	Nr 11	Nr 12
AU101	2	10	13	4	0	3	0	0	7	0	2	7
AU143	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
AU145	8	9	12	1	3	7	5	0	11	1	14	5
AU47	1	2	0	6	2	4	1	4	5	2	3	0
AU5	0	4	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
AD1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
AU10	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AU12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AU113	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
AUH13	0	2	0	4	1	2	0	0	0	0	0	0
AU16	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
AD160	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
AU17	0	4	1	0	1	2	0	0	0	0	2	0
AU18	2	4	0	3	0	1	1	0	1	0	0	0
AU25	0	4	0	1	0	1	1	0	1	0	0	3
AU27	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
EAD101	0	2	6	2	1	3	6	7	10	0	2	0
EAD102	0	0	0	3	1	1	0	6	0	0	0	0
EAD103	0	1	0	3	1	2	0	4	0	0	0	0
EAD104	1	2	6	2	1	5	5	7	8	0	4	0
AD19	1	3	0	1	1	2	0	0	1	0	0	2
AD38	0	2	1	0	0	2	1	0	1	0	0	0
AD76	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD81	1	0	0	2	2	2	0	0	0	0	2	2
AD84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AD86	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AD51	1	2	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0
AD52	1	0	1	3	1	2	2	0	2	0	0	0
AD53	1	2	1	1	3	2	0	0	1	0	1	0
AD54	1	0	1	0	2	1	0	0	1	0	1	1
AD55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
AD56	0	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
AD57	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0

AD58	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AD100	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	0	2
AD101	2	0	0	1	3	1	0	0	0	0	0	0
AD103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AD104	1	0	0	3	0	1	0	0	1	0	6	0
AD105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

STRESS	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5	Nr 6	Nr 7	Nr 8	Nr 9	Nr 10	Nr 11	Nr 12
AU101	2	4	3	0	0	0	5	3	2	0	0	11
AU145	5	9	9	2	5	5	4	13	13	10	16	9
AU47	2	7	6	3	2	7	8	2	1	1	2	4
AU5	2	1	3	0	4	6	0	0	0	0	0	0
AD1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
AU12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AUH13	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0
AU16	0	0	0	0	4	4	3	0	0	0	0	0
AU17	0	3	0	0	3	5	3	3	0	0	1	0
AU18	0	0	0	0	2	2	3	0	0	1	0	0
AU25	0	0	0	0	3	2	2	0	3	0	1	0
AU27	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
EAD101	5	5	8	5	10	10	3	10	8	6	6	4
EAD102	1	0	2	0	2	2	5	6	0	0	0	0
EAD103	1	0	2	0	4	2	2	3	0	0	0	0
EAD104	8	6	7	5	9	8	6	8	7	8	6	3
AD19	0	0	0	0	0	4	2	0	3	0	1	0
AD38	1	2	8	2	4	4	7	9	0	0	1	0
AD81	0	0	0	0	2	1	1	0	3	0	2	0
AD85	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
AD86	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
AD51	1	1	3	0	3	1	1	1	1	2	1	1
AD52	2	1	3	1	2	3	3	0	1	0	1	0
AD53	1	1	0	0	1	0	1	1	2	0	1	0
AD54	0	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0
AD57	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
AD58	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
AD100	1	0	0	0	2	2	0	0	0	0	1	0
AD101	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

AD104	0	0	0	0	3	1	0	0	1	0	0	0
AD105	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Smärta med Stress	Nr 1	Nr 2	Nr 3	Nr 4	Nr 5	Nr 6	Nr 7	Nr 8	Nr 9	Nr 10	Nr 11	Nr 12
AU101	1	0	4	6	3	1	0	3	4	2	1	2
AU145	6	22	7	5	7	5	8	15	11	16	13	8
AU47	4	3	5	2	8	4	2	6	2	1	7	3
AU5	3	0	6	1	1	1	0	4	0	1	0	0
AD1	3	0	0	0	1	2	0	0	1	0	0	0
AU10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
AU113	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
AUH13	2	2	0	2	3	0	0	2	0	2	1	0
AU16	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
AU17	0	0	0	0	2	1	0	2	0	1	1	0
AU18	1	0	4	0	3	1	0	1	0	1	1	3
AU25	2	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0
AU27	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
EAD101	5	9	1	5	12	10	7	9	5	5	6	11
EAD102	0	0	2	1	1	0	0	1	0	0	0	1
EAD103	0	0	4	0	1	0	0	2	0	2	1	1
EAD104	9	7	4	4	11	12	6	8	4	5	3	9
AD19	3	2	1	0	5	8	0	0	0	1	0	0
AD30	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
AD38	1	1	5	6	3	3	0	11	1	7	5	0
AD81	1	1	0	0	6	0	0	0	0	0	3	2
AD84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
AD51	1	3	3	0	2	1	0	1	1	1	0	2
AD52	2	1	1	1	2	0	3	1	1	1	0	1
AD53	1	4	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0
AD54	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0

AD56	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
AD58	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AD100	0	0	2	0	0	1	0	1	0	1	2	0
AD101	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
AD104	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0